

Nachweis der Hautresorption von Heparin und Heparinoiden

Otto Burk

1962

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Nachweis der Hautresorption
von Heparin und Heparinoiden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Otto Burk

aus

Bad Vilbel

1962

Berichterstatter: Herr Prof.Dr.W.Seitz

Mitberichterstatter:

Dekan: Herr Prof.Dr.W.Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 5.6.1962



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Problematik	5
Eigene Untersuchungen	7
Methodik	7
Versuchsreihen	10
Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	29
Diskussion	72
Zusammenfassung	74
Literaturverzeichnis	75

PROBLEMATIK

M a t h i e s und Mitarbeiter (1 - 11) haben in früheren Arbeiten die Wirkungsweise hyaluronidasehemmender Substanzen näher untersucht. Sie konnten feststellen, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung von Salizylaten, Phenylbutazon, Chloräthylbenz-methoxazon und Nebennierenrindenhormonderivaten an eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark gebunden zu sein scheint. Im weiteren Verlauf scheinen die freigesetzten Nebennierenmark-Katecholamine Heparin aus den Mastzellen zu mobilisieren (12). Demzufolge wirkt auch experimentell appliziertes Heparin hyaluronidasehemmend. M a t h i e s (7, 12) und Mitarbeiter (13 - 16) konnten feststellen, daß bereits geringste Heparindosen, die noch keinen meßbaren Einfluß auf die Blutgerinnung zeigen, sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen hyaluronidasehemmend wirksam sind. Eine maximale Hyaluronidasehemmung wird nach den genannten Untersuchungen bei der Ratte bereits mit 1,5 - 15 Einheiten pro 100 g Tier i. v. = ca. 0,015 - 0,15 mg Heparin (Liquemin), beim Menschen mit 2000 Einheiten pro Versuchsperson = ca. 20 mg erzielt. Mit der Bestimmung der hyaluronidasehemmenden Wirkung des Heparins ist es also möglich, bereits geringe Heparinmengen zu erfassen, die mit Gerinnungstesten nicht nachweisbar sind. Eine hyaluronidasehemmende Wirkung haben auch Heparinabkömmlinge, die auf Grund ihrer chemischen Verschiedenheit gegenüber dem Heparin ihre gerinnungsverlängernde Wirkung weitgehend eingebüßt haben. So hat W i l l m s (17) nachweisen können, daß "Sp 54", ein Xylanpolyschwefelsäure-ester, in gleicher Dosierung wie Heparin hyaluronidasehemmend wirksam ist, obwohl er nur etwa 1/40 der gerinnungshemmenden Wirkung gegenüber dem Liquemin besitzt. Die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins und der Heparinabkömmlinge ist demnach nicht an ihre blutgerinnungshemmende Wirkung gebunden. Die genannten Versuche beziehen sich auf die Hyaluronidasehemmung des Heparins in vivo. Die Methodik war die gleiche, wie sie dieser Arbeit zugrunde gelegt wurde (siehe unten).

Es wurde der Einfluß bestimmter Substanzen und insbesondere des Heparins auf das Hyaluronidase-Spreading untersucht. Demzufolge bestätigt die Methode eine Aussage über die Beeinflussung der

Hyaluronidaseaktivität lediglich im Sinne des Hyaluronidase-Spreadings also im Sinne einer unspezifischen Hyaluronidasehemmung. Aus den genannten Gründen bietet sich die Bestimmung der Hyaluronidaseaktivität im obengenannten Sinne als Methode zum Nachweis hyaluronidasehemmender Substanzen an. In der vorgelegten Arbeit sollte durch Bestimmung der Beeinflussung des Hyaluronidase-Spreadings durch kutane Heparin- oder Heparinoid-Applikation eine etwaige Aufnahme des Heparins durch die Haut nachgewiesen werden. Eine früher bereits durchgeführte Untersuchung der Salbengrundlage von Thrombocidsalbe ohne Thrombocid, ergab keine statistisch gesicherte Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings (21), sodaß ein Verzicht auf weitere Untersuchungen von Salbengrundlagen berechtigt erschien. Es wurde bereits betont, daß mit der Hyaluronidasehemmung schon sehr geringe Heparinmengen nachgewiesen werden können. Die unten genannten Versuchsreihen umfassen verschiedene Salbenzubereitungen von Heparin und mehreren Heparinoiden unter Verwendung verschiedener Salbengrundlagen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

METHODIK

Die experimentellen Untersuchungen in der vorgelegten Arbeit wurden ausschließlich an männlichen weißen Ratten mit einem Gewicht zwischen 135 und 220 g durchgeführt. - Als Grundlage diente der sogenannte Spreading-Test, der eine Messung der Hyaluronidaseaktivität und deren Hemmung zuläßt. Alle verwandten Lösungen wurden an jedem Versuchstag frisch angesetzt.

Während der Experimente lagen die Tiere in Evipannarkose, die nach W i l h e l m i (18) keinen störenden Einfluß auf die Hyaluronidaseaktivität ausübt. Die Evipaninjektion wurde während eines kurzen Ätherrausches subkutan verabreicht; dabei kamen auf 100 g Tier 0,3 ml einer Evipanlösung (0,5 g Ampulle in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung).

Nachdem die Tiere auf ein Versuchsbrett aufgespannt waren, ermöglichte Pilca-Creme (Enthaarungsmittel) eine schonende Entfernung der Haare auf der Brust-Bauchseite von der Clavicular- bis in die Leistengegend, ohne Verletzungen der Epidermis hervorzurufen. Nach genügender Säuberung sorgten über die enthaarten Hautflächen gebreitete Zellstoffstreifen für eine Aufrechterhaltung der Hauttemperatur.

Zum Setzen der Quaddeln diente eine Lösung von Hyaluronidase in einem Farbstoff (150 E in 2 ml einer 0,6 ‰igen Evansblue-Lösung, Lösungsmittel: physiol. Kochsalzlösung) und reiner Farbstoff (0,6 ‰ige Evans-blue-Lösung). Nur die Bauchhaut vom unteren Thoraxrand bis in die Leistengegend eignete sich wegen ihrer etwa gleichmäßigen Gewebsbeschaffenheit für die Untersuchungen. Sie gestattete die Anordnung von 3 Quaddelpaaren. Neben jede Quaddel mit Hyaluronidase wurde eine Vergleichsquaddel mit reinem Farbstoff gesetzt. Für jede Quaddel wurden 0,1 ml der entsprechenden Lösungen verwandt, die mit Tuberkulin-Spritzen und dünnen Kanülen (Kanülen-Nr. 18) intrakutan injiziert werden konnten. Für Injektionen, von denen angenommen werden mußte, daß sie nicht intrakutan lagen, wurden Ersatzquaddeln in unmittelbarer Nähe gesetzt.

Nach M a d i n a v e i t i a (19) verläuft das Hyaluronidase-Spreading zweiphasig und ist nur in den ersten 10 Minuten eine echte Wirkung der Hyaluronidase. Die Ausbreitung der Quaddeln muß demzufolge 10 Minuten nach der Injektion registriert werden. Technisch ist das möglich, indem man mit einem Tintenstift oder mit Tusche die Quaddelgrenzen auf der Rattenhaut punktiert, sie an Hand dieser Punkte auf einen durchsichtigen Zelluloidstreifen überträgt und planimetrisch den Flächeninhalt bestimmt. Die Flächengröße dient als Maß für die Hyaluronidaseaktivität.

In der vorgelegten Arbeit wurde die hemmende Wirkung verschiedener Salben geprüft. Es ergab sich dabei folgende Versuchsanordnung: Ein Leerversuch mit einem Quaddelpaar orientierte über die Hyaluronidaseaktivität ohne Einwirkung hemmender Substanzen. Daran anschließend wurde ein erbsengroßes Stück der zu prüfenden Salbe rasch auf der Thoraxhaut dünn aufgetragen. Auf der Bauchhaut jeder Ratte war dann noch Raum für die Injektion von zwei Quaddelpaaren zu zwei verschiedenen Zeiten. Es wurde die Hemmung geprüft 20', 40', 60', 80' und teilweise 100' und 120' nach Auftragen der Salbe.

Um die Möglichkeit einer direkten Diffusion der Salbe von der Brusthaut in die Bauchhaut auszuschließen, wurde bei einigen Tieren die Haut am unteren Thoraxrand durchtrennt.

In den nachstehenden Tabellen wurde die Quaddelanordnung wie auf dem Rattenbauch beibehalten, so daß die oberen Zahlen die Flächengröße der thoraxnahen, die unteren die Größe der Quaddeln in der Leistengegend angeben.

Beispiel:

	Thorax	
L	122	195
20	101	176
40	96	159
	Leistengegend	

In den Versuchsreihen 1, 2, 5, 7, 8 und 9 wurden die Quaddeln der Leerversuche am unteren Thoraxrand gesetzt. In den Reihen 3, 4, 6 und 10 wechselte ihre Lokalisation zwischen Thoraxnähe, Bauchmitte und Leistengegend, so daß eine Beeinflussung der Untersuchungen durch etwaige Gewebsunterschiede statistisch nicht ins Gewicht fällt.

VERSUCHSREIHEN

1. Versuchsreihe

Nach oben beschriebener Methodik wurde die Wirkungsweise einer 1 %igen Heparinsalbe (Liquemin) untersucht. Salbentyp: Öl-in-Wasser-Emulsion; Salbenbasis: Partialglyceridgemisch höherer Fettsäuren. Bei 5 Tieren wurden Quaddelpaare 20 und 40 Minuten nach Auftragen der Salbe gesetzt (Versuchsreihe 1a), bei 5 Tieren 60 und 80 Minuten danach (Versuchsreihe 1b). Die Ergebnisse sind aus Tabelle 1 und 2 zu ersehen. Die Zahlen geben die planimetrierte Quaddelfläche in qmm an.

2. Versuchsreihe

In Versuchsreihe 2 wurden die Tiere mit handelsüblicher Thrombophobsalbe getestet. In 100 g Salbe sind enthalten: 5000 I.E. Heparin (also 0,05 %) und 0,25 g Pyridin- β -carbonsäurebenzylester. Die Ergebnisse nach 20 und 40 Minuten (Versuchsreihe 2a) zeigt Tabelle 3, die Ergebnisse nach 60 und 80 Minuten (Versuchsreihe 2b) Tabelle 4.

3. Versuchsreihe

In Versuchsreihe 3 wurde die Wirkung einer 0,1 %igen Thrombocidsalbe untersucht. Salbentyp: Öl-in-Wasser-Emulsion; Salbenbasis: selbstemulgierende Salbengrundlage mit einem Ölsäureester als Fettkomponente. Die Ergebnisse zeigen die Tabellen 5 und 6. Bei Tier 6 und 7 in Tabelle 5 wurde die Haut am unteren Thoraxrand durchtrennt. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen sind bei der Errechnung der Mittelwertprozente für Abbildung 2 nicht berücksichtigt.

4. Versuchsreihe

Als Salbe diente ebenfalls eine 0,1 %ige Thrombocidsalbe. Salbentyp: Öl-in-Wasser-Emulsion; Salbenbasis: Gemisch höherer gesättigter Fettalkohole und Fettalkohol-Sulfonate mit Zusatz von nichtionogenen Emulgatoren und einem Ölsäureester als Fettkompo-

nente. Außer nach 20 und 40 Minuten (Tabelle 7, Versuchsreihe 4a) und nach 60 und 80 Minuten (Tabelle 8, Versuchsreihe 4b) wurde in Versuchsreihe 4c die Hemmung nach 100 und 120 Minuten untersucht (Tabelle 9).

5. Versuchsreihe

Bei gleicher Versuchsanordnung wie in den obigen Reihen wurde die Wirkung einer 1%igen Thrombocidsalbe untersucht. Die Zusammensetzung entsprach der Liqueaminsalbe in Reihe 1. Heparin wurde durch 1 % Thrombocid ersetzt. Die Tabellen 10 und 11 zeigen die Ergebnisse.

6. Versuchsreihe

In Versuchsreihe 6 wurde eine 1 %ige Thrombocidsalbe verwandt. Salbentyp und Salbenbasis entsprachen der Zusammensetzung in Versuchsreihe 3. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 12 und 13 zu ersehen.

7. Versuchsreihe

Bei gleicher Methodik wurde eine 0,1 %ige Thrombocidsalbe verwandt. Salbentyp: Öl-in-Wasser-Emulsion; Salbenbasis: höhere gesättigte Fettalkohole und ein Ölsäureester mit einem nichtionogenen Emulgator auf der Basis eines Fettalkohol-Äthylenoxyd-Kondensationsproduktes. Als Hyperämikum enthielt sie 0,1 % Thymol. Tabelle 14 zeigt die Versuchsergebnisse nach 20 und 40 Minuten (Versuchsreihe 7a), Tabelle 15 die Ergebnisse nach 60 und 80 Minuten (Versuchsreihe 7b).

8. Versuchsreihe

Für die Untersuchungen in Versuchsreihe 8 diente ebenfalls eine 0,1 %ige Thrombocidsalbe in gleicher Zusammensetzung wie in Versuchsreihe 7; nur trat Nikotinsäure-benzylester (0,1 %) als Hyperämikum an die Stelle von Thymol. Die Ergebnisse sind aus den Tabellen 16 und 17 zu ersehen.

9. Versuchsreihe

In Versuchsreihe 9 diente die handelsübliche Hirudoidsalbe für

die Untersuchungen. Die Ergebnisse sind aus den Tabellen 18 und 19 zu ersehen.

10. Versuchsreihe

In Versuchsreihe 10 wurde ebenfalls Hirudoidsalbe verwandt, jedoch war dem Untersucher nicht bekannt, um welches Präparat es sich handelte. Die Salben der Versuchsreihen 3, 4, 6, 10 wurden ihm unter einer Kennnummer übergeben, so daß eine subjektive Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen war. In Abbildung 4 können die Kurven für die Versuchsreihen 9 und 10 verglichen werden. Die Ergebnisse der Versuchsreihe 10 sind aus Tabelle 20 und 21 zu ersehen.

ZEICHENERKLÄRUNG ZU DEN TABELLEN

Zeit	=	Verstrichene Zeit in Minuten nach Auftragen der Salbe
F	=	Farbstoffquaddel ohne Hyaluronidase
FH	=	Farbstoffquaddel mit Hyaluronidase
L	=	Leerversuch vor Auftragen der Salbe

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	PH	Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	PH
1	175	L	104	241	1	145	L	118	245
		20	124	233			60	113	184
		40	114	182			80	106	179
2	185	L	134	225	2	135	L	135	238
		20	128	182			60	118	213
		40	124	171			80	118	214
3	185	L	145	220	3	145	L	135	183
		20	119	190			60	110	187
		40	120	174			80	112	195
4	185	L	133	218	4	180	L	110	232
		20	109	186			60	128	225
		40	95	180			80	137	200
5	195	L	129	245	5	150	L	107	214
		20	115	199			60	131	230
		40	108	210			80	145	222

Tabelle 1
(Versuchsreihe 1a)

Tabelle 2
(Versuchsreihe 1b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	165	L	145	180
		20	125	180
		40	117	179
2	145	L	146	228
		20	135	185
		40	135	183
3	155	L	128	225
		20	122	183
		40	150	195
4	195	L	148	209
		20	120	205
		40	118	204
5	145	L	135	240
		20	138	215
		40	145	199

Tabelle 3

(Versuchsreihe 2a)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	185	L	118	215
		60	135	207
		80	116	175
2	165	L	142	244
		60	149	215
		80	120	200
3	155	L	130	236
		60	137	190
		80	129	203
4	165	L	140	218
		60	125	170
		80	130	187
5	140	L	132	230
		60	118	181
		80	142	196

Tabelle 4

(Versuchsreihe 2b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH
1	175	L	122	195
		20	101	176
		40	96	159
2	195	L	121	135
		40	130	182
		20	122	180
3	180	40	137	190
		20	173	170
		L	142	190
4	200	40	152	176
		L	136	199
		20	135	155
5	195	L	114	241
		40	127	190
		20	121	185
6	185	L	302	172
		20	241	131
		40	208	101
7	205	L	274	168
		20	297	150
		40	269	119

Tabelle 5
Versuchsreihe 3 a

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH
1	175	L	151	241
		60	129	227
		80	112	215
2	185	L	138	280
		60	148	244
		80	143	199
3	175	80	162	201
		L	161	220
		60	135	175
4	180	60	143	270
		80	148	235
		L	144	270
5	170	80	134	230
		L	170	251
		60	129	229

Tabelle 6
Versuchsreihe 3b

Bei Tier 6 und 7 wurde die
Thoraxhaut durchtrennt.

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH	Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH
1	205	L	109	173	1	170	60	136	212
		20	87	170			80	113	245
		40	88	172			L	130	203
2	185	L	123	203	2	195	60	140	218
		20	111	148			L	197	239
		40	95	143			80	177	228
3	195	20	133	212	3	180	80	150	191
		L	159	255			L	133	253
		40	122	205			60	172	201
4	205	20	127	162	4	205	L	158	242
		L	126	192			60	138	240
		40	139	161			80	114	162
5	185	20	174	230	5	190	80	170	214
		40	148	239			L	160	282
		L	152	273			60	122	211

Tabelle 7
(Versuchsreihe 4a)

Tabelle 8
(Versuchsreihe 4b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	195	120	143	233
		L	174	256
		100	114	227
2	200	L	163	201
		100	158	244
		120	127	221
3	190	120	167	223
		L	145	251
		100	154	232
4	190	L	106	250
		100	110	230
		120	107	252
5	190	120	141	206
		100	173	237
		L	125	216

Tabelle 9

(Versuchsreihe 4c)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	215	L 20 40	127 134 129	224 227 205
2	155	L 20 40	149 112 120	242 214 189
3	155	L 20 40	160 139 129	253 214 199
4	190	L 20 40	160 137 135	225 216 180
5	155	L 20 40	135 120 112	228 210 167

Tabelle 10

(Versuchsreihe 5a)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	185	L 60 80	138 120 119	231 200 205
2	155	L 60 80	142 138 124	249 209 197
3	165	L 60 80	135 120 119	260 210 200
4	185	L 60 80	143 143 125	230 215 195
5	220	L 60 80	155 133 130	270 239 208

Tabelle 11

(Versuchsreihe 5b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	190	40	150	219
		L	185	241
		20	165	200
2	160	20	146	248
		40	150	223
		L	136	210
3	195	20	137	216
		40	135	239
		L	155	234
4	200	40	180	268
		L	160	250
		20	138	250
5	175	L	133	214
		20	140	223
		40	130	180

Tabelle 12

(Versuchsreihe 6a)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	160	60	122	259
		80	150	172
		L	130	244
2	180	L	204	329
		60	180	294
		80	167	265
3	190	L	170	209
		60	160	217
		80	134	230
4	195	80	164	225
		L	163	292
		60	141	270
5	180	60	123	207
		80	140	221
		L	122	229

Tabelle 13

(Versuchsreihe 6b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH
-------------	--------------	------	---	----

1	140	L	133	205
		20	137	203
		40	127	185
2	145	L	128	200
		20	124	198
		40	109	171
3	140	L	130	190
		20	140	195
		40	118	170
4	140	L	130	189
		20	120	192
		40	130	175
5	145	L	148	226
		20	137	214
		40	111	200

Tabelle 14

(Versuchsreihe 7a)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH
-------------	--------------	------	---	----

1	140	L	120	226
		60	131	185
		80	119	188
2	185	L	136	206
		60	125	194
		80	112	172
3	140	L	120	224
		60	123	190
		80	104	183
4	155	L	131	226
		60	125	200
		80	120	210
5	145	L	136	245
		60	100	198
		80	130	198

Tabelle 15

(Versuchsreihe 7b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH
1	140	L	104	226
		20	128	225
		40	135	190
2	165	L	133	260
		20	112	250
		40	106	255
3	160	L	144	229
		20	130	239
		40	133	228
4	150	L	151	267
		20	120	250
		40	140	239
5	140	L	100	224
		20	120	220
		40	120	228

Tabelle 16

(Versuchsreihe 8a)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	FH
1	130	L	128	205
		60	154	205
		80	120	194
2	140	L	124	248
		60	138	234
		80	-	-
3	155	L	123	230
		60	112	200
		80	94	197
4	160	L	129	213
		60	119	240
		80	110	217
5	155	L	135	235
		60	103	240
		80	145	233

Tabelle 17

(Versuchsreihe 8b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	PH
1	145	L	130	215
		20	103	175
		40	89	164
2	145	L	100	200
		20	110	175
		40	104	160
3	175	L	120	246
		20	108	218
		40	113	181
4	195	L	101	230
		20	104	180
		40	132	180
5	135	L	124	209
		20	135	199
		40	110	156

Tabelle 18

(Versuchsreihe 9a)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	F	PH
1	140	L	102	221
		60	118	180
		80	90	172
2	130	L	137	206
		60	112	169
		80	110	190
3	140	L	136	214
		60	138	185
		80	118	168
4	145	L	128	223
		60	108	196
		80	108	179
5	140	L	114	230
		60	117	195
		80	135	200

Tabelle 19

(Versuchsreihe 9b)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	170	40	150	190
		I	162	289
		20	115	178
2	195	I	172	257
		20	162	174
		40	135	172
3	185	I	148	207
		20	116	193
		40	113	157
4	215	40	152	263
		I	156	247
		20	143	239
5	215	40	139	242
		20	126	254
		I	120	259

Tabelle 20

(Versuchsreihe 10a)

Tier Nr.	Gew. in g	Zeit	P	PH
1	205	80	146	255
		I	139	182
		60	151	191
2	170	80	122	174
		60	139	220
		I	158	240
3	170	I	128	282
		60	147	238
		80	113	175
4	155	I	143	231
		60	134	169
		80	131	186
5	160	80	130	209
		I	139	239
		60	135	169

Tabelle 21

(Versuchsreihe 10b)

Erklärung zu den Abbildungen

Die Abbildungen zeigen die graphische Darstellung der Hyaluronidasehemmung durch die verschiedenen Salben. "% Hemmung" bedeutet die prozentuale Hemmung der Mittelwerte jeder Versuchsreihe. Die Mittelwerte stellen das arithmetische Mittel aller Quaddelflächen einer Zeit in einer Versuchsreihe dar. Die prozentuale Hemmung läßt sich dann nach folgender Beziehung errechnen:

$$\frac{(FH_v - FH_n) \times 100}{FH_v - F_v}$$

Darin bedeuten:

FH_v = Farbstoff + Hyaluronidasequaddel vor Salbenapplikation

FH_n = Farbstoff + Hyaluronidasequaddel nach Salbenapplikation

F_v = reine Farbstoffquaddel vor Salbenapplikation

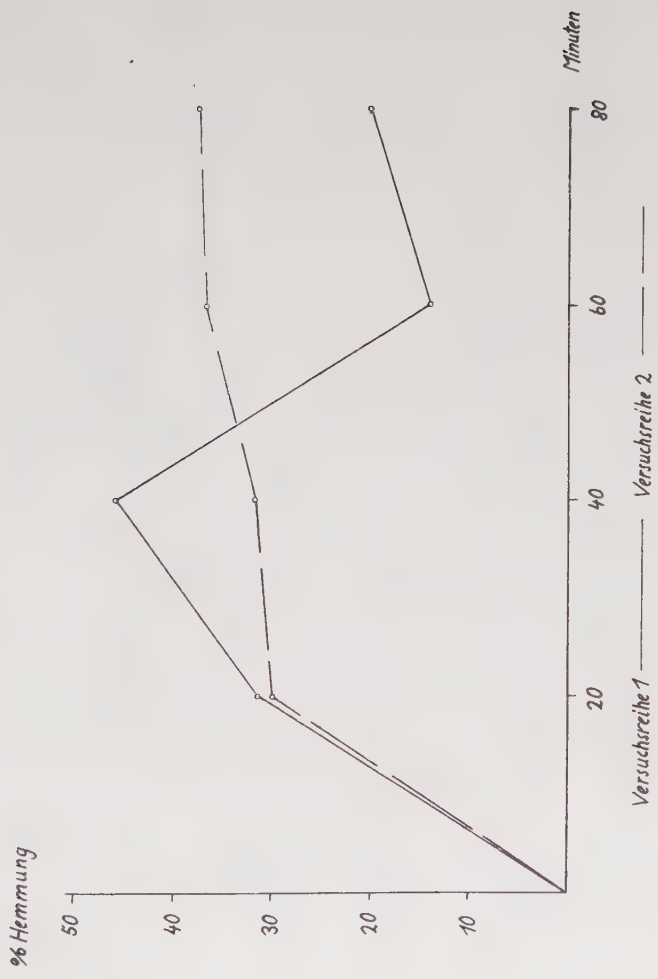


Abb. 1

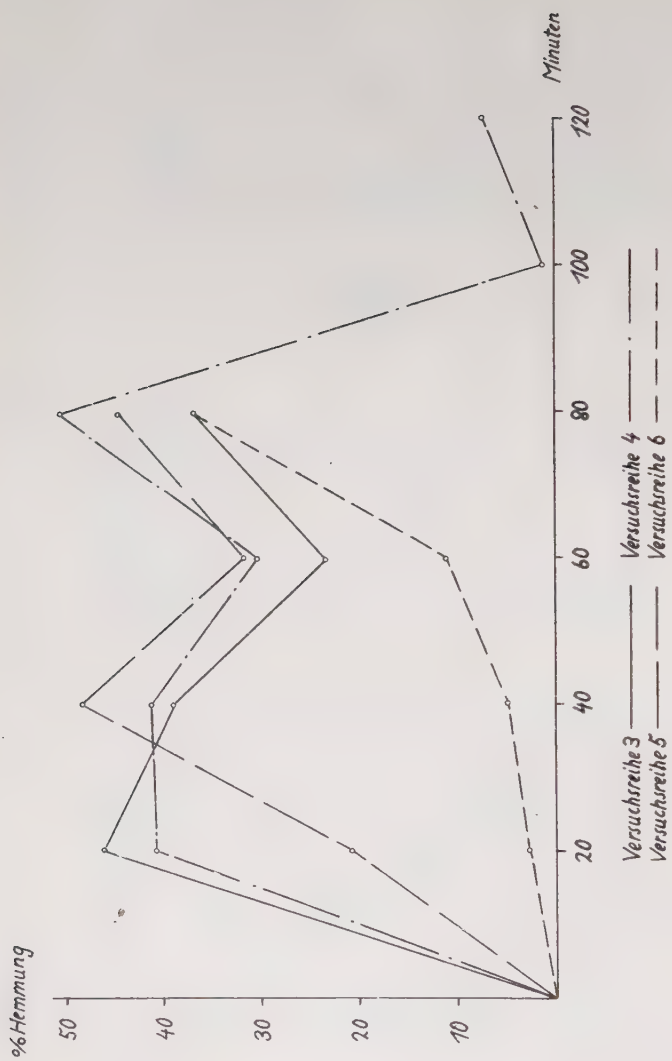


Abb. 2

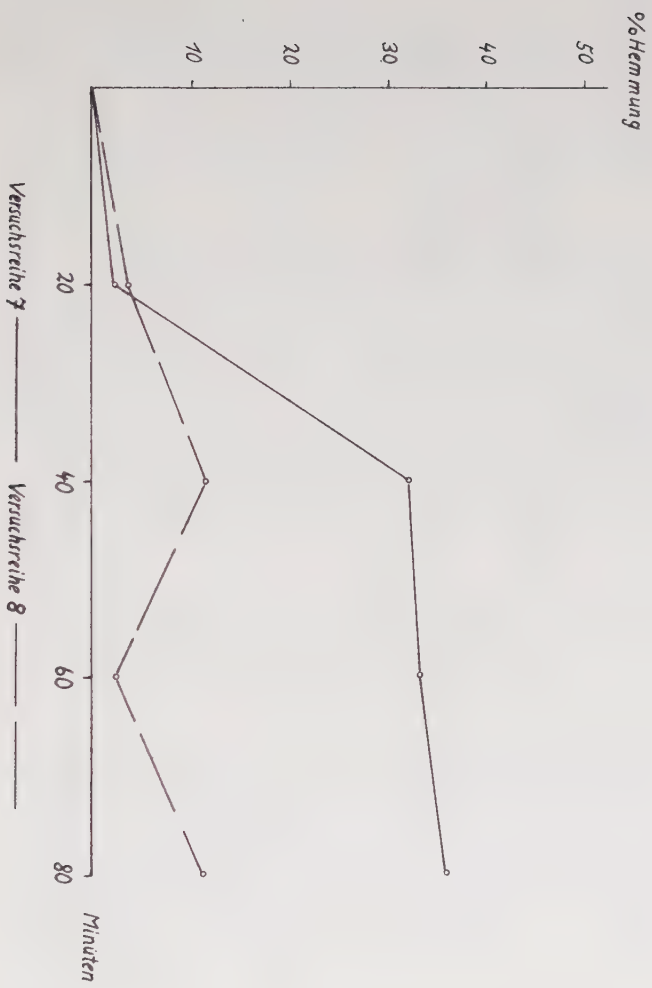


Abb. 3

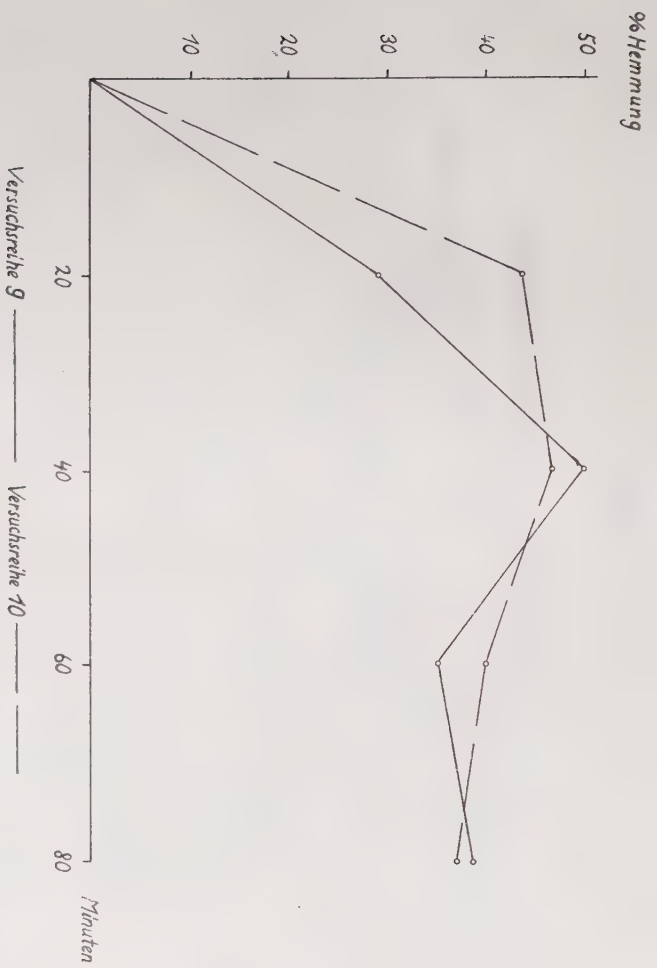


Abb. 4

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistisches Modell und Methodik

Primäre Aufgabe der statistischen Auswertung von Versuchsergebnissen ist es, die Gesamt-Variabilität der beobachteten Werte in 2 Haupt-Komponenten zu zerlegen, und zwar in eine Komponente, die durch systematische Faktoren bedingt ist und eine andere Komponente, welche die experimentelle Variabilität darstellt. Diejenige Komponente der Gesamt-Variabilität, die durch systematische Faktoren bedingt ist, muss selber noch in so viele Komponenten zerlegt werden, als systematische Faktoren bei dem betreffenden Versuch zu berücksichtigen sind.

Im Falle der vorliegenden Versuche muss prinzipiell mit 2 systematischen Faktoren gerechnet werden, nämlich einmal dem Einfluss des jeweiligen Versuchstieres und zum anderen dem Einfluss der jeweiligen Versuchszeit, zu der die Hyaluronidase-(Hyase-)Aktivität bestimmt wurde. Die Erfahrung bei der Auswertung früherer Versuche, insbesondere bei der Auswertung methodischer Versuche hat gezeigt, dass man diesen systematischen Einflüssen am besten gerecht wird, wenn man der statistischen Auswertung ein lineares Modell zugrunde legt. Bezeichnet man einen Messwert, der an dem Versuchstier V zu dem Zeitpunkt t des Versuches bestimmt wurde mit

$$x(V;t),$$

so wird bei diesem Modell angenommen, dass sich dieser Messwert in der nachstehenden Form darstellen lässt:

$$x(V;t) = a_V + b_t + \varepsilon.$$

Die beiden Größen a_V bzw. b_t dieses Ausdruckes sind hierbei konstante Parameter, die nur von dem jeweiligen Versuchstier bzw. nur von der jeweiligen Versuchszeit abhängen und ausserdem voneinander unabhängig sind. Diese beiden Parameter bringen den systematischen Einfluss des jeweiligen Versuchstieres bzw. der jeweiligen Versuchszeit auf den Messwert zum Ausdruck. Die Größe ε dagegen ist der Ausdruck desjenigen Anteils der Variabilität der Messwerte, der durch zufällige Einflüsse bedingt ist und den

wir weiterhin mit "experimentelle Variabilität" bezeichnen. Das angegebene Modell ist nur dann vollständig, wenn man über die Grösse ϵ noch gewisse Voraussetzungen macht. Diese lauten dahingehend, dass ϵ eine normal verteilte Zufallsvariable ist mit dem Erwartungswert 0 und einer Varianz σ^2 , die nur von der Versuchsanordnung, jedoch nicht von dem jeweiligen Versuchstier bzw. von der jeweiligen Versuchszeit abhängt.

Aufgabe der statistischen Auswertung ist es, nach Festlegung des statistischen Modelles optimale Schätzungen für die Parameter, die in das Modell eingehen, und für die experimentelle Variabilität zu ermitteln. Dies geschieht im vorliegenden Falle nach der "Methode der kleinsten Quadrate", wobei die experimentelle Variabilität mit Hilfe einer zweifachen Varianz-Analyse geschätzt wird. In den Varianz-Analysen ergibt sich diese Schätzung als "Rest-Varianz".

Hinsichtlich der Schätzung der Parameter sei hier nur erwähnt, in welcher Weise die Parameter b_t , die zu den verschiedenen Zeitpunkten t des Versuches gehören, geschätzt werden. Es bedeutet hierzu $\bar{x}(t)$ das arithmetische Mittel aus allen Messwerten, die zu dem Zeitpunkt t an sämtlichen Versuchstieren einer Versuchsreihe beobachtet wurden. Bei passender Normierung der individuellen Konstanten a_v der einzelnen Versuchstiere, ist dann $\bar{x}(t)$ eine optische Schätzung im Sinne der "Methode der kleinsten Quadrate" für die zum Zeitpunkt t gehörige Konstante b_t . Innerhalb einer Versuchsreihe liegt eine Veränderung der Hyase-Aktivität bzw. der Diffusionsgeschwindigkeit einer Quadrel nur dann vor, wenn die zu verschiedenen Zeiten gehörigen Konstanten b_t sich voneinander unterscheiden. Zur statistischen Prüfung der Frage, ob in einer Versuchsreihe eine solche Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit vorliegt, war daher zu prüfen, ob die beobachteten Messwerte mit der Hypothese verträglich sind, dass die zu den verschiedenen Zeitpunkten des Versuches gehörigen Konstanten b_t untereinander gleich sind. Trifft dies nicht zu, so kann als statistisch gesichert gelten, dass während der Versuchsreihe eine Änderung in der Diffusionsgeschwindigkeit auftritt.

Bei der vorliegenden Versuchsanordnung wird die oben genannte Hypothese am zweckmässigsten mit Hilfe einer zweifachen Varianz-Analyse geprüft, wobei die "Varianz zwischen Versuchsstufen", die sich hierbei ergibt, ein Mass für die Abweichung des experimentell beobachteten Sachverhaltes von der zu prüfenden Hypothese darstellt. Ist diese Varianz-Komponente statistisch gesichert grösser als die Schätzung der experimentellen Variabilität, die sogenannte Rest-Varianz, so ist die Prüfungshypothese zu verwerfen, d.h. es liegt eine statistisch gesicherte Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit des jeweiligen Quaddel-Typus vor.

Der anderen, in der Varianz-Analyse auftretenden Varianz-Komponente, "Varianz zwischen den Tieren", kommt unmittelbar für die vorliegende Fragestellung keine Bedeutung zu. Sie drückt lediglich aus, in welcher Weise sich das "individuelle Reaktionsniveau" der einzelnen Versuchstiere voneinander unterscheidet. Ist sie statistisch wesentlich grösser als die experimentelle Variabilität, so bedeutet dies, dass zu verschiedenen Versuchstieren verschiedene Parameter a_v gehören. Auf Grund des linearen Modelles kann der zu einem Versuchstier V gehörige Parameter a_v als das zu diesem Tier gehörige "individuelle Reaktionsniveau" gedeutet werden.

Liefert die Varianz-Analyse einen statistisch gesicherten Hinweis dafür, dass während einer Versuchsreihe eine Änderung in der Diffusionsgeschwindigkeit eingetreten ist, so folgt hieraus, dass mindestens zu einem Zeitpunkt nach Applikation der Prüf-Substanz die Diffusionsgeschwindigkeit sich gegenüber dem Ausgangswert statistisch gesichert verändert hat. Es ist dann zunächst zu prüfen, in welcher Richtung diese Veränderung verlaufen ist, ob eine Vergrösserung oder eine Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeit stattgefunden hat. Die Richtung der Veränderung kann dadurch ermittelt werden, dass man die Differenz zwischen dem zum Zeitpunkt t gehörigen Parameter b_t und dem Parameter b_0 berechnet, der zum Ausgangswert gehört. Selbstverständlich lassen sich aus den Versuchen nur Schätzwerte für diese Differenz ermitteln; diese Schätzwerte stellen sich in der Form der Mittelwertsdifferenz

$$\delta \bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(0)$$

dar, wobei $\bar{x}(0)$ derjenige Mittelwert ist, der zu dem unbeeinflussten Ausgangswert gehört. Eine Hemmung der Diffusionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t des Versuches gegenüber dem Ausgangswert liegt nur dann vor, wenn die zugehörige Mittelwertdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ einen negativen Wert besitzt.

Bei allen denjenigen Versuchsreihen, bei denen die Varianz-Analyse eine gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des jeweiligen Quaddel-Typus ergab, musste noch geprüft werden, ob sich diese Veränderung gleichmässig auf die beiden Quaddeln nach Applikation der Prüfsubstanz auswirkt und ob diese beiden Quaddeln sich selber untereinander unterscheiden. Dies geschieht mit Hilfe eines "orthogonalen Vergleiches", wobei zwei weitere Varianz-Komponenten berechnet werden, die insgesamt die "Varianz zwischen Versuchsstufen" ergeben. Es handelt sich hierbei um die Varianz-Komponente "zwischen Kontrolle und Versuchsstufen" und die Varianz-Komponente "zwischen Versuchszeiten". Mit Hilfe der ersten dieser beiden Varianz-Komponenten wird geprüft, ob die Diffusionsgeschwindigkeiten der beiden Quaddeln nach Applikation der Prüf-Substanz im Mittel sich von der Diffusionsgeschwindigkeit der Kontroll-Quaddel vor Applikation der Substanz unterscheiden. Diese Varianz-Komponente wird wiederum mit der experimentellen Variabilität, d.h. mit der Rest-Varianz verglichen. Ist die Varianz-Komponente "zwischen Kontrollen und Versuchsstufen" gesichert grösser als die Rest-Varianz, so bedeutet dies, dass zu den beiden Zeitpunkten nach Applikation der Prüf-Substanz eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit vorliegt. Ist ausserdem die Varianz-Komponente "zwischen Versuchs-Zeiten" gesichert grösser als die experimentelle Variabilität, d.h. die Rest-Varianz, so bedeutet dies, dass die Diffusionsgeschwindigkeit nach Applikation der Prüf-Substanz ausserdem noch von dem Zeitpunkt ihrer Bestimmung abhängt.

Aus Gründen der experimentellen Technik könnten bei den vorliegenden Versuchen keine Doppelbestimmungen am gleichen Versuchstier zur gleichen Versuchszeit durchgeführt werden (auf Grund

der beschränkten Buchhaut der Versuchstiere); daher konnte die Richtigkeit des zugrunde gelegten statistischen Modelles auch nicht unmittelbar mit Hilfe der vorliegenden Versuche geprüft werden. Dabei ist unter "Richtigkeit" eine angemessene Übereinstimmung zwischen den Werten, die auf Grund des statistischen Modelles erwartet werden müssten und denjenigen Werten, die tatsächlich beobachtet worden sind, zu verstehen. Immerhin gibt es eine Möglichkeit zumindest abzuschätzen, ob das gewählte Modell vernünftig ist. Hierzu gingen wir folgendermassen vor.

Die zum Zeitpunkt t einer Versuchsreihe an sämtlichen Versuchstieren gemessenen Werte weisen eine bestimmte Variabilität auf, als deren Mass wir die empirische Varianz $s^2(t)$ dieser Messwerte ansahen. Wenn das gewählte statistische Modell den realen Sachverhalt in angemessener Weise wiedergibt, muss erwartet werden, dass die zu verschiedenen Zeiten gehörigen empirischen Varianzen $s^2(t)$ alles Schätzwerte der gleichen übergeordneten Varianz sind, d.h. dass sie untereinander homogen sein müssen. Ob diese Annahme zutrifft, kann mit Hilfe des BARTLETT-Tests geprüft werden. Bei allen Versuchsreihen wurde daher auch der BARTLETT-Test durchgeführt. Es sei jedoch bemerkt, dass es sich hier mehr um eine Plausibilitäts-Betrachtung handelt, als um einen exakten statistischen Test zur Prüfung der Richtigkeit des Modelles.

Abschliessend sei bemerkt, dass die Auswertung der Ergebnisse für die reine Farbstoff-Quaddel und für die Farbstoff+Hyase-Quaddel getrennt vorgenommen wurde, da die Erfahrung gezeigt hat, dass sich die beiden Quaddel-Typen in unterschiedlicher Weise verhalten. Das zugrunde gelegte statistische Modell war jedoch in beiden Fällen das gleiche.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Das Ergebnis der durchgeführten Varianz-Analysen haben wir in den Tabellen 22 - 42 dargestellt. Es bedeuten in den Schemata der Varianz-Analysen:

- n : die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
 SAQ : das Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
 MAQ : das Mittlere-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
 $F_{emp.}$: der Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz);
 p : die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten $F_{emp.}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung.

Am Fusse jeder Varianz-Analyse ist das Ergebnis des BARTLETT-Tests angegeben, den wir zur Prüfung der Übereinstimmung zwischen dem gewählten Modell und dem realen Sachverhalt durchführten. Es bedeutet hierin " n " die Zahl der Freiheitsgrade der Chi-Quadrat-Verteilung, welcher die Prüfgrösse $\chi^2_{emp.}$ genügt, wenn die Hypothese zutrifft, dass die verglichenen Varianzen $s^2(t)$ untereinander homogen seien.

Die Mittelwerte $\bar{x}(t)$ der zu jedem Zeitpunkt t an den Versuchstieren beobachteten Werte, die empirischen Varianzen $s^2(t)$ dieser Werte und die Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(0)$ finden sich in den Tabellen 43 - 63. Soweit sich aus den Varianz-Analysen ergeben hat, dass zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten zu den verschiedenen Zeitpunkten einer Versuchsreihe statistisch gesicherte Unterschiede vorliegen, haben wir in diesen Tabellen auch das Ergebnis des orthogonalen Vergleiches angegeben. Hierzu wurde in der mit "Sicherung" überschriebenen Spalte angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit behauptet werden kann, die betreffende Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ sei gesichert von 0 verschieden. Nur wenn diese Irrtumswahrscheinlichkeit nicht grösser als 5 % ist, kann behauptet werden, dass zu dem betreffenden Zeitpunkt eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des betreffenden Quaddel-Typus gegenüber dem Ausgangswert vor Applikation der Prüf-Substanz vorliegt. Eine ausreichende statistische Sicherung für diese Behauptung liegt allerdings erst dann vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit nicht grösser als 1 % ist.

Schliesslich enthalten die Tabellen 43 - 63 die in üblicher Weise berechnete prozentuale Hemmung für jeden Zeitpunkt des Versuches.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Nur bei einer einzigen Versuchsreihe besitzt die Prüf-Grösse $\chi^2_{\text{emp.}}$ des BARTLETT-Tests eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die kleiner als 5 % ist. Bei der Vielzahl der durchgeführten Tests - insgesamt 40 Stück - ist ein solches Ereignis zu erwarten, da es sich ja bei der Prüfgrösse, wenn die zu prüfende Hypothese zutrifft, um eine Zufallsvariable handelt, die wie χ^2 verteilt ist. Dies bedeutet, dass sich aus den Ergebnissen des BARTLETT-Tests kein Hinweis dafür ergibt, dass die Prüf-Hypothese, die miteinander verglichenen Varianzen $s^2(t)$ seien untereinander homogen, nicht zutrifft. Es kann daher behauptet werden, dass zumindest in dieser Hinsicht das statistische Modell den realen Sachverhalt angemessen wiedergibt.

Eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel ergibt sich aus den Varianz-Analysen nur bei der Versuchsreihe 7. Das Vorzeichen der zugehörigen Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t)$ zeigt, dass es sich hierbei um eine Verringerung in der Diffusionsgeschwindigkeit nach der Applikation der Salbe handelt; der orthogonale Vergleich ergibt, dass diese Veränderung statistisch hoch gesichert ist. Aus dem orthogonalen Vergleich ergibt sich für die beiden Teilversuchsreihen a) und b) weiter, dass sich die je 2 reinen Farbstoff-Quaddeln nach Applikation der Prüfsubstanz nicht wesentlich unterscheiden.

Die Ergebnisse, die bei der statistischen Auswertung über die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyase-Quaddel gewonnen wurden, sollen nunmehr für die einzelnen Versuchsreihen besprochen werden.

Versuchsreihe 1:

Nur zu den Zeitpunkten 20' und 40' nach Applikation der Salbe liegt eine gesicherte Hemmung der Hyase-Aktivität gegenüber dem Ausgangswert vor (Irrtumswahrscheinlichkeit 0.1%). Ein Unterschied in der Hyase-Aktivität zwischen diesen beiden Zeitpunkten lässt sich statistisch nicht sichern. Allerdings deutet die Grösse der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ dar-

auf hin, dass die Hyase-Hemmung 40' nach Applikation der Salbe etwas grösser ist als zum Zeitpunkt 20'.

Versuchsreihe 2:

Hier zeigt sich wiederum zu allen Zeitpunkten nach Applikation der Salbe eine statistisch hoch gesicherte Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyase-Quaddel; aus der Grösse und dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ ergibt sich, dass es sich hierbei um eine Hemmung der Hyase-Aktivität handelt. Die grösste Hemmung dieser Hyase-Aktivität tritt zu den Zeitpunkten 60' und 80' nach Anwendung der Salbe auf; die Diffusionsgeschwindigkeit zwischen diesen Zeitpunkten unterscheidet sich praktisch nicht.

Versuchsreihe 3:

Hier ergibt sich für die Teil-Versuchsreihe a) eine statistisch hoch gesicherte, für die Teil-Versuchsreihe b) eine statistisch schwach gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyase-Quaddel. Aus den orthogonalen Vergleichen und aus der Grösse bzw. dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t)$ folgt, dass es sich hierbei um eine hoch gesicherte Hemmung der Hyase-Aktivität zu den Zeitpunkten 20' und 40' und um eine schwach gesicherte Hemmung der Hyase-Aktivität zu den Zeitpunkten 60' und 80' nach Applikation der Salbe handelt. Zwischen den Zeitpunkten 20' und 40' bzw. 60' und 80' lassen sich keine gesicherten Veränderungen der Hyase-Aktivität nachweisen.

Versuchsreihe 4:

Hier ergibt sich aus den Varianz-Analysen nur für die Teil-Versuchsreihe a) eine statistisch gesicherte Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyase-Quaddel. Grösse und Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ und die orthogonalen Vergleiche zeigen, dass es sich hierbei um eine Hemmung der Hyase-Aktivität zu den Zeitpunkten 20' und 40' nach Applikation der Salbe handelt, wobei die Hyase-Aktivität zu diesen beiden Zeitpunkten annähernd gleich ist.

Versuchsreihe 5:

Aus den Varianz-Analysen ergibt sich, dass für beide Teil-Versuchsreihen nach Applikation der Salbe statistisch gesicherte Veränderungen in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyase-Quaddel auftreten. Aus den orthogonalen Vergleichen ergibt sich, dass diese Veränderungen für die Zeitpunkte 40', 60' und 80' statistisch hoch gesichert sind, wobei es sich, wie die Grösse und das Vorzeichen der Mittelwertsdifferenzen zeigen, um eine Hemmung der Hyase-Aktivität handelt. Der maximale Wert der Hyase-Hemmung tritt auch hier zum Zeitpunkt 80' nach Applikation auf, allerdings unterscheidet er sich nicht wesentlich von derjenigen zum Zeitpunkt 60'. Zum Zeitpunkt 20' nach Applikation dagegen liegt noch keine gesicherte Hyase-Hemmung vor.

Versuchsreihe 6:

Für keine der beiden Teil-Versuchsreihen ergaben die beiden Varianz-Analysen Hinweise dafür, dass gesicherte Veränderungen in der Hyase-Aktivität nach Applikation der Substanz eintreten.

Versuchsreihe 7:

Hier liegt zu sämtlichen Zeitpunkten eine statistisch gesicherte Veränderung in der Hyase-Aktivität nach Applikation der Salbe vor. Die Grösse der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ zeigt, dass diese Hemmung der Hyase-Aktivität am stärksten zum Zeitpunkt 80' nach Applikation der Salbe wirksam wird. Darüber hinaus zeigt der orthogonale Vergleich, dass zwischen der Hyase-Aktivität zu den Zeitpunkten 20' und 40' ebenfalls gesicherte Unterschiede bestehen; aus der Grösse der Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t)$ ergibt sich, dass es sich hierbei um eine stärkere Hemmung zum Zeitpunkt 40' nach Applikation handelt. Ein gesicherter Unterschied in der Hyase-Aktivität zwischen den Zeitpunkten 60' und 80' konnte nicht nachgewiesen werden.

Versuchsreihe 8:

Zu keinem Zeitpunkt nach Applikation der Salbe konnte bei dieser Versuchsreihe eine statistisch gesicherte Veränderung in der Aktivität der Farbstoff+Hyase-Quaddel nachgewiesen werden..

Versuchsreihe 9:

Hier liegt ebenfalls zu sämtlichen Zeitpunkten eine statistisch hoch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hyase-Quaddel gegenüber ihrem Ausgangswert vor, wobei sich aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ ergibt, dass es sich hierbei um eine Hemmung der Hyase-Aktivität handelt. Aus der Grösse der Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t)$ ergibt sich, dass diese Hemmung ihren maximalen Wert zum Zeitpunkt 40' erreicht. Zu den späteren Zeitpunkten nimmt die Hemmung wieder ab. Ausserdem ergab sich aus dem orthogonalen Vergleich, dass zwischen den Zeitpunkten 20' und 40' noch eine schwach gesicherte Veränderung in der Hyase-Aktivität eintritt.

Versuchsreihe 10:

Hier ergeben die Varianz-Analysen nur für die Zeitpunkte 20' und 40' nach Applikation der Salbe, dass eine statistisch gesicherte Veränderung in der Hyase-Aktivität eintritt. Grösse und Vorzeichen der Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t)$ sowie das Ergebnis des orthogonalen Vergleiches zeigen, dass es sich hierbei um eine Hemmung der Hyase-Aktivität handelt, die zu den beiden Zeitpunkten annähernd den gleichen Wert besitzt. Diese Hemmung ist allerdings statistisch nur schwach gesichert.

Es erscheint notwendig, abschliessend noch eine Bemerkung über die Grösse der experimentellen Variabilität bei den vorliegenden Versuchen zu machen. Wie eine Inspektion der Rest-Varianzen der Varianz-Analysen ergibt, ist diese experimentelle Variabilität bei verschiedenen Versuchsreihen sehr gross. Eine Folge hiervon ist, dass in vielen Fällen keine statistisch gesicherte

Hemmung der Hyase-Aktivität nachweisbar war, obschon die Mittelwertsdifferenzen $\delta \bar{x}(t)$ sehr gross waren. Es darf vermutet werden, dass die Grösse der experimentellen Variabilität durch die Schwierigkeit einer gleichmässigen Dosierung der Salben bedingt ist.

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	723	180°7	1°54	-
Zwischen Ver-Stufen	2	714	357°0	3°04	-
Rest - Varianz	8	938	117°2		
Gesamt - Varianz	14	2.375	169°6		

$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1.906; 30 \% < p.$

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	2.140	535°0	3°79	-
Zwischen Ver.Stufen	2	5.629	2.814°5	19°96	0°1 %
Zw.Kontrolle u.V.Z.	1	5.096	5.096°0	36°14	0°1 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	533	533°0	3°78	-
Rest - Varianz	8	1.128	141°0		
Gesamt - Varianz	14	8.897	635°5		

$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1.003; 50 \% < p.$

T a b e l l e 22

=====

(Versuchsreihe 1a)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	436	109°0	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	35	17°5	-	
Rest - Varianz	8	1.733	216°6		
Gesamt - Varianz	14	2.204	157°4		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1.399; p = 30 \%$$

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	2.645	661°2	1°91	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	1.105	552°5	1°60	-
Rest - Varianz	8	2.765	345°6		
Gesamt - Varianz	14	6.515	465°4		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0.612; p = 70 \%$$

T a b e l l e 23

=====

(Versuchsreihe 1b)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	312	78°0	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	389	194°5	1°34	-
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	-	-		
Zw. Versuchs-Zeiten	1	-	-		
Rest - Varianz	8	1.157	144°6		
Gesamt - Varianz	14	1.858	132°7		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 2.116; 30 \% < p.$$

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.929	482°2	3°30	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	1.953	976°5	6°69	1 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	1.936	1.936°0	13°27	1 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	17	17°0	-	
Rest - Varianz	8	1.167	145°9		
Gesamt - Varianz	14	5.049	360°6		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1.881; 30 \% < p.$$

T a b e l l e 24

=====

(Versuchsreihe 2a)

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	304	76°0	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	1.031	515°5	3°09	-
Rest - Varianz	8	1.335	166°9		
Gesamt - Varianz	14	1.426	101°9		

$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 0.176; 90 \% < p.$

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.369	342°2	2°49	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	4.368	2.184°0	15°89	1 %
Zw.Kontrolle u.V. Zeiten	1	4.368	4.368°0	31°79	0.1 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	-	-		
Rest-Varianz	8	1.099	137°4		
Gesamt - Varianz	14	6.836	488°3		

$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 1.191; 50 \% < p.$

T a b e l l e 25

=====

(Versuchsreihe 2b)

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	3.653	913°2	5°12	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	29	14°5	-	
Rest - Varianz	8	1.428	178°5		
Gesamt - Varianz	14	5.110	365°0		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 2°517; 20 \% < p.$$

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	2.100	525°0	2°99	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	4.344	2.172°0	12°36	1 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	4.248	4.248°0	24°18	1 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	96	96°0	-	
Rest - Varianz	8	1.406	175°7		
Gesamt - Varianz	14	7.850	560°7		

$$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 2°667; 20 \% < p.$$

T a b e l l e 26

=====

(Versuchsreihe 3a)

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	754	188*5	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	723	361*5	1*84	-
Rest - Varianz	8	1.575	196*9		

Gesamt - Varianz 14 3.052 218*0

$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 2*297; 30 \% < p.$

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	5*775	1.443*7	4*86	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	3.402	1.701*0	5*72	5 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	2.980	2.980*0	10*03	5 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	422	422*0	1*42	-
Rest - Varianz	8	2.377	297*1		

Gesamt - Varianz 14 11.554 825*3

$n = 2; \chi^2_{\text{emp.}} = 2*157; 30 \% < p.$

T a b e l l e 27

(Versuchsreihe 3b)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	7.314	1.828*5	11*00	1 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	593	296*5	1*78	-
Rest-Varianz	8	1.329	166*1		

Gesamt - Varianz 14 9.236 659*7

$n = 2$; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0*712$; 70 % < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	16.755	4.188*7	26*75	0*1 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	4.084	2.042*0	13*04	1 %
Zw.Kontrolle u.V.zeiten	1	4.083	4.083*0	26*07	0*1 %
Zw.Versuchs-zeiten	1	1	1*0	-	
Rest-Varianz	8	1.253	156*6		

Gesamt - Varianz 14 22.092 1.578*0

$n = 2$; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0*139$; 90% < p.

T a b e l l e 28

=====

(Versuchsreihe 4a)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	3.482	870*5	1*57	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	538	269*0	-	
Rest - Varianz	8	4.437	554*6		
Gesamt - Varianz	14	8.457	604*1		

$n = 2$; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.977$; 50 % < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	993	248*2	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	3.505	1.752*5	1*92	-
Rest - Varianz	8	7.297	912*1		
Gesamt - Varianz	14	11.795	842*5		

$n = 2$; $\chi^2_{\text{emp.}} = 2.441$; 20 % < p.

T a b e l l e 29

=====

(Versuchsreihe 4b)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	4.261	1.065*2	2*17	-
Zwischen Vers. Stufen	2	92	46*0	-	
Rest - Varianz	8	3.917	489*6		
Gesamt - Varianz	14	8.270	590*7		

n = 2; $\chi^2_{emp.} = 0.269$; 80 % p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.396	349*0	1*19	-
Zwischen Vers. Stufen	2	138	69*0	-	
Rest - Varianz	8	2.355	294*4		
Gesamt - Varianz	14	3.889	277*8		

n = 2; $\chi^2_{emp.} = 5.582$; 5 % p.

T a b e l l e 30
=====

(Versuchsreihe 4c)

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	291	72*7	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	638	319*0	3*95	-
Rest - Varianz	8	645	80*6		
Gesamt - Varianz	14	1.574	112*4		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0*130$; 90% < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.686	421*5	23*41	0*1 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	1.476	738*0	41*00	0*1 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	456	456*0	25*33	0*1 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	1.020	1.020*0	56*67	0*1 %
Rest - Varianz	8	144	18*0		
Gesamt - Varianz	14	3.306	236*1		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 1*155$; 50% < p.

T
=
(7e . c')

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	175	43°7	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	350	175°0	1°34	-
Rest - Varianz	8	1.041	130°1		
Gesamt - Varianz	14	1.566	111°9		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.570$; 70 % < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1,122	280°5	3°57	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	3.789	1.894°5	24°10	0°1%
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	3.763	3.763°0	47°87	0°1%
Zw.Versuchs-Zeiten	1	26	26°0	-	
Rest - Varianz	8	629	78°6		
Gesamt - Varianz	14	5.540	395°7		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 2.962$; 20 % < p.

T a b e l l e 32

=====

(Versuchsreihe 5b)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	2.109	527°2	7°13	1 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	186	93°0	-	
Rest - Varianz	8	1.712	214°0		
Gesamt - Varianz	14	4.007	286°2		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 1.407$; 30 % < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	4.050	1.012°5	2°62	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	41	20°5	-	
Rest - Varianz	8	3.084	385°5		
Gesamt - Varianz	14	7.175	512°5		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 1.609$; 30 % < p.

T a b e l l e 33

=====

(Versuchsreihe 6a)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	5.723	1.430*7	5*85	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	398	199*0	-	
Rest - Varianz	8	1.956	244*5		

Gesamt - Varianz 14 8.077 576*9

$n = 2$; $\chi^2_{emp.} = 2*474$; 20 % p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	14.114	3.528*5	5*17	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	3.912	1.956*0	2*86	-
Rest - Varianz	8	5.457	682*1		

Gesamt - Varianz 14 23.483 1.677*3

$n = 2$; $\chi^2_{emp.} = 0*691$; 70 % p.

T a b e l l e 34
=====

(Versuchsreihe 6b)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.119	279°7	3°46	-
Zwischen Vers.Stufen	2	1.296	648°0	8°01	1 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	1.267	1.267°0	15°66	1 %
Zw. Versuchs-Zeiten	1	29	29°0	-	
Rest - Varianz	8	647	80°9		
Gesamt - Varianz	14	3.062	218°7		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0°977$; 50 % < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	503	125°7	1°44	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	4.524	2.262°0	25°88	0°1 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	3.060	3.060°0	35°01	0°1 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	1.464	1.464°0	16°75	1 %
Rest - Varianz	8	699	87°4		
Gesamt - Varianz	14	5.726	409°0		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 1°726$; 30 % p.

T a b e l l e 35

=====

(Versuchsreihe 7a)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	538	134*5	4*91	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	938	469*0	17*12	0*1 %
Zw.Kontrolle u.V.zeiten	1	801	801*0	29*23	0*1 %
Zw.Versuchs-zeiten	1	137	137*0	5*00	-
Rest - Varianz	8	219	27*4		
Gesamt - Varianz	14	1.695	121*1		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 2*496$; 20 % < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.428	357*0	3*60	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	5.849	2.924*5	29*51	0*1 %
Zw.Kontrolle u.V.zeiten	1	5.387	5.387*0	54*36	0*1 %
Zw.Versuchs-zeiten	1	462	462*0	4*66	-
Rest - Varianz	8	793	99*1		
Gesamt - Varianz	14	8.070	576*4		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 4*746$; 5 % < p.

T a b e l l e 36

=====

(Versuchsreihe 7b)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.395	348*7	1*61	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	71	35*5	-	
Rest - Varianz	8	1.729	216*1		
Gesamt - Varianz	14	3.195	228*2		

n = 2 ; $\chi^2_{\text{emp.}} = 4*776$; 5% < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	3.821	955*2	8*11	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	452	226*0	1*92	-
Rest - Varianz	8	942	117*7		
Gesamt - Varianz	14	5.215	372*5		

= 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 1*133$; 50 % < p.

T a b e l l e 37

(Versuchsreihe 8a)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.078	269*5	1*02	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	236	118*0	-	
Rest - Varianz	8	2.108	263*5		
Gesamt - Varianz	14	3.422	244*4		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 6*831$; 2 % < p.

Farbstoff + Hyase - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	3.082	770*5	6*34	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	403	201*5	1*65	-
Rest - Varianz	8	973	121*6		
Gesamt - Varianz	14	4.458	318*4		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0*070$; 95 % p.

T a b e l l e 38

=====

(Versuchsreihe 8b)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	598	149*5	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	73	36*5	-	
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten		-	-		
Zw.Versuchs-Zeiten		-	-		
Rest - Varianz	8	1.817	227*1		
Gesamt - Varianz	14	2.488	177*7		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.125$; 90 % < p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	2.200	550*0	5*46	5 %
Zwischen Versuchs-Stufen	2	6.816	3.408*0	33*84	0*1 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	5.796	5.796*0	57*55	0*1 %
Zw.Versuchs-Zeiten	1	1.020	1.020*0	10*12	5 %
Rest - Varianz	8	806	100*7		
Gesamt - Varianz	14	9.822	701*6		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.832$; 50 % < p.

T a b e l l e 39

(Versuchsreihe 9a)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	1.216	304°0	1°87	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	316	158°0	-	
Rest - Varianz	8	1.299	162°4		
Gesamt - Varianz	14	2.831	202°2		

n = 2; $\chi^2_{emp.} = 0°508$; 70 % p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	878	215°5	2°69	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	4.203	2.101°5	25°81	0°1 „
Zw.Kontrolle u.V.zeiten	1	4.177	4.177°0	51°51	0°1 „
Zw.Versuchs-zeiten	1	26	26°0	-	
Rest - Varianz	8	651	81°4		
Gesamt - Varianz	14	5.732	409°4		

n = 2; $\chi^2_{emp.} = 0°480$; 70 % p.

Table 46

Table 46

(continued on p. 59)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	2.156	539°0	2°18	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	980	490°0	1°98	-
Rest - Varianz	8	1.976	247°0		
Gesamt - Varianz	14	5.112	365°1		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.279$; 80 % p.

Farbstoff + Hyase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	10.242	2.560°5	2°94	-
Zwischen Versuchs-Stufen	2	6.951	3.475°5	15°49	1 %
Zw.kontrolle u.V.zeiten	1	6.931	6.931°0	7°96	5 %
Zw.Versuchs-zeiten	1	20	20°0	-	
Rest - Varianz	8	6.958	869°7		
Gesamt - Varianz	14	24.151	1.725°1		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.716$; 50 % p.

Tabelle 41

(Versuchsreihe 16a)

Farbstoff - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	425	106°2	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	555	277°5	2°56	
Rest - Varianz	8	866	108°2		
Gesamt - Varianz	14	1.846	131°8		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.908$; 50 % < p.

Farbstoff + Hyase - Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p.
Zwischen Tieren	4	2.110	527°5	-	
Zwischen Versuchs-Stufen	2	4.383	2.191°5	1°54	-
Rest - Varianz	8	11.380	1.422°5		
Gesamt - Varianz	14	17.873	1.276°6		

n = 2; $\chi^2_{\text{emp.}} = 0.037$; 95 % < p.

T a b e l l e 42

=====

(Versuchsreihe 10b)

	$\bar{y}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	129	230			
H_v	230	154			
$E_{20'}$	119	55	- 10		
$H_{20'}$	198	422	- 32	28°9 %	0°1 %
$E_{40'}$	112	129	- 17		
$H_{40'}$	183	241	- 47	42°2 %	0°1 %

T a b e l l e 43

=====

(Versuchsreihe 1a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	121	179			
H_v	222	617			
$E_{60'}$	120	84	- 1		
$H_{60'}$	208	454	- 14	14°5 %	-
$E_{80'}$	124	278	+ 3		
$H_{80'}$	202	281	- 20	20°2 %	-

T a b e l l e 44

=====

(Versuchsreihe 1b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
D_v	140	73			
H_v	217	450			
$D_{20'}$	128	64	- 12		
$H_{20'}$	195	211	- 22	27*3 %	1 %
$D_{40'}$	133	229	- 7		
$H_{40'}$	192	113	- 25	30*4 %	1 %

T a b e l l e 45

=====

(Versuchsreihe 2a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
D_v	132	91			
H_v	229	148			
$D_{60'}$	133	141	+ 1		
$H_{60'}$	193	340	- 36	36*8 %	0*1 %
$D_{80'}$	127	102	- 5		
$H_{80'}$	192	129	- 37	37*2 %	0*1 %

T a b e l l e 46

=====

(Versuchsreihe 2b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	127	134			
H_v	212	578			
$E_{20'}$	130	715	+ 3		
$H_{20'}$	173	134	- 39	46*5 %	1 %
$E_{40'}$	128	421	+ 1		
$H_{40'}$	179	165	- 33	39*1 %	1 %

T a b e l l e 47

=====

(Versuchsreihe 3a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	153	166			
H_v	252	563			
$E_{60'}$	137	72	- 16		
$H_{60'}$	229	1.206	- 23	21*4 %	5 %
$E_{80'}$	140	344	- 13		
$H_{80'}$	216	268	- 36	33*3 %	5 %

T a b e l l e 48

=====

(Versuchsreihe 3b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	134	440			
H_v	219	1.828			
$E_{20'}$	126	1.025	- 8		
$H_{20'}$	184	1.219	- 35	37.4 %	0.1 %
$E_{40'}$	118	696	- 16		
$H_{40'}$	184	1.455	- 35	37.8 %	0.1 %

T a b e l l e 49

=====

(Versuchsreihe 4a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	156	726			
H_v	244	809			
$E_{60'}$	142	339	- 14		
$H_{60'}$	216	211	- 28	28.4 %	-
$E_{80'}$	145	915	- 11		
$H_{80'}$	208	1.052	- 36	37.1 %	-

T a b e l l e 50

=====

(Versuchsreihe 4b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	143	764			
H_v	235	610			
$E_{100'}$	142	792	- 1		
$H_{100'}$	234	44	- 1	0.8 %	-
$E_{120'}$	137	488	- 6		
$H_{120'}$	228	283	- 7	7.2 %	-

T a b e l l e 51

=====

(Versuchsreihe 4c)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	134	66			
H_v	202	225			
$E_{20'}$	132	80	- 2		
$H_{20'}$	200	74	- 2	2*2 %	-
$E_{40'}$	119	87	- 15		
$H_{40'}$	180	158	- 22	29*5 %	1 %

T a b e l l e 52

=====

(Versuchsreihe 5a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	129	66			
H_v	225	191			
$E_{60'}$	121	144	- 8		
$H_{60'}$	193	37	- 32	31*0 %	0*1 %
$E_{80'}$	117	94	- 12		
$H_{80'}$	190	210	- 35	34*1 %	0*1 %

T a b e l l e 53

=====

(Versuchsreihe 5b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	154	441			
H_v	230	298			
$E_{20'}$	145	135	- 9		
$H_{20'}$	227	459	- 3	3.0 %	-
$E_{40'}$	149	380	- 5		
$H_{40'}$	226	1.027	- 4	5.0 %	-

T a b e l l e 54

(Versuchsreihe 6a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	158	1.091			
H_v	261	2.449			
$E_{60'}$	145	620	- 13		
$H_{60'}$	249	1.338	- 12	10.7 %	-
$E_{80'}$	151	209	- 7		
$H_{80'}$	223	1.105	- 38	35.2 %	-

T a b e l l e 55

(Versuchsreihe 6b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	146	221			
H_v	234	160			
$E_{20'}$	128	139	- 18	1 %	1 %
$H_{20'}$	216	41	- 18	17*9 %	0*1 %
$E_{40'}$	125	81	- 21		
$H_{40'}$	192	99	- 42	41*9 %	0*1 %

T a b e l l e 56

=====

(Versuchsreihe 7a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	143	58			
H_v	248	310			
$E_{60'}$	131	110	- 12		0*1 %
$H_{60'}$	215	215	- 33	28*8 %	0*1 %
$E_{80'}$	123	21	- 20		0*1 %
$H_{80'}$	201	29	- 47	40*6 %	0*1 %

T a b e l l e 57

=====

(Versuchsreihe 7b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	126	539			
H_v	241	424			
$E_{20'}$	122	52	- 4		
$H_{20'}$	237	194	- 4	3°8 %	-
$E_{40'}$	127	190	+ 1		
$H_{40'}$	228	573	- 13	11°4 %	-

T a b e l l e 58

=====

(Versuchsreihe 8a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	128	23			
H_v	226	298			
$E_{60'}$	125	425	- 3		
$H_{60'}$	224	387	- 2	2°3 %	-
$E_{80'}$	118	349	- 10		
$H_{80'}$	214	329	- 12	11°7 %	-

T a b e l l e 59

=====

(Versuchsreihe 8b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	115	188			
H_v	220	330			
$E_{20'}$	112	173	- 3		
$H_{20'}$	188	287	- 32	29.3 %	0.1 %
$E_{40'}$	110	242	- 5		
$H_{40'}$	168	134	- 52	48.1 %	0.1 %

T a b e l l e 60

=====

(Versuchsreihe 9a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	123	228			
H_v	219	84			
$E_{60'}$	119	134	- 4		
$H_{60'}$	185	125	- 34	33.5 %	0.1 %
$E_{80'}$	112	267	- 11		
$H_{80'}$	182	173	- 37	36.7 %	0.1 %

T a b e l l e 61

=====

(Versuchsreihe 9b)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	152	389			
H_v	252	873			
$E_{20'}$	132	400	- 20		
$H_{20'}$	208	1.339	- 44	39°7 %	5 %
$E_{40'}$	138	244	- 14		
$H_{40'}$	205	2.088	- 47	42°3 %	5 %

T a b e l l e 62

=====

(Versuchsreihe 10a)

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	141	117			
H_v	235	1.269			
$E_{60'}$	141	56	0		
$H_{60'}$	197	953	- 38	38°2 %	-
$E_{80'}$	128	149	- 13		
$H_{80'}$	200	1.151	- 35	35°8 %	-

T a b e l l e 63

=====

(Versuchsreihe 10b)

DISKUSSION

Mit der oben ausführlich beschriebenen Versuchsanordnung wurde eine statistisch signifikante Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings durch Anwendung fast aller geprüfter Heparin- bzw. Heparinoidsalben nachgewiesen. Prinzipiell wird durch die Versuchsergebnisse wahrscheinlich gemacht, daß bei Verwendung einer geeigneten Salbengrundlage Heparin und Heparinoide in geringen Mengen durch die Haut aufgenommen werden können. Der hemmende Einfluß auf das Hyaluronidase-Spreading konnte an der Rattenbauchhaut nach Einreibung der Brusthaut mit Heparin- bzw. Heparinoidsalben gezeigt werden. Eine intrakutane Ausbreitung des Heparins von der Brust- zur Bauchhaut ist unwahrscheinlich, da in Vergleichsversuchen auch bei Durchtrennung der Haut am unteren Thoraxrand der hyaluronidasehemmende Effekt auftreten kann. Wir haben mit der Bestimmung der Beeinflussung der Hyaluronidaseaktivität eine Methode in der Hand, mit der die umstrittene Resorptionsmöglichkeit von Heparin und Heparinoiden durch die Haut bestätigt werden konnte. Damit ist allerdings nicht erwiesen, daß Heparin in so großen Mengen resorbiert wird, die einen Einfluß auf die Blutgerinnung ausüben können.

Der Aussagewert der Methodik wird gestärkt durch die beiden Untersuchungsreihen mit Hirudoid-Salbe. In Reihe 10 war dem Untersucher nicht bekannt, mit welchem Präparat er arbeitete. Die beiden fast übereinstimmenden Diagramme in Abbildung 4 zeigen, daß die Wirkungsweise der Salbe in zwei verschiedenen Versuchsreihen zu nahezu gleichen Ergebnissen führte.

Hyperämika scheinen sich nicht immer vorteilhaft auf die Resorption auszuwirken; jedenfalls führten sie bei zwei sonst gleich zusammengesetzten 0,1 %igen Thrombocid-Salben zu recht unterschiedlichen Ergebnissen (Abbildung 3). In Versuchsreihe 7 war zu allen Zeitpunkten nach Aufträgen der Salbe eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität zu beobachten. Als Hyperämikum diente Thymol. In Reihe 8 dagegen ist zu keinem Zeitpunkt

eine statistisch gesicherte Hemmung nachzuweisen. Als Hyperämikum wurde Nikotinsäure-Benzylester verwandt. In zwei weiteren Versuchsreihen mit 0,1 %iger Thrombocid-Salbe (Versuchsreihe 3 und 4, Abbildung 2) liegt eine statistisch nachweisbare Veränderung der Hyaluronidaseaktivität vor. Die beiden Salben enthielten bei verschiedener Salbengrundlage keine Hyperämika.

In Versuchsreihe 3 und 6 haben wir bei Verwendung der gleichen Salbengrundlage verschiedene Thrombocidkonzentrationen (0,1u.1%) verglichen. Dabei zeigte sich, daß im zeitlichen Bereich der Versuche von 80 Minuten bei der stärkeren Konzentration keine statistisch gesicherte Hemmung festgestellt werden konnte. Der Kurvenverlauf zeigt, daß bei 0,1%iger Thrombocidsalbe eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität wesentlich früher, bereits 20 Minuten nach Salbenapplikation deutlich wird, während die 1%ige Thrombocidsalbe erst nach 80 Minuten das gleiche Ausmaß der Hemmung erreicht. Da die Untersuchungen nicht über den Zeitraum von 80 Minuten hinaus verfolgt wurden, läßt sich keine Aussage über den weiteren Kurvenverlauf machen. Das gleiche Verhalten ist im übrigen bei Adrenalininjektionen (20) bekannt, bei denen auch höhere Dosen zu einem späteren Zeitpunkt eine maximale Hyaluronidasehemmung erkennen lassen.

Daß die Salbengrundlage einen Einfluß auf die Resorptionsverhältnisse auszuüben scheint, zeigen die Diagramme der Versuchsreihen 5 und 6 in Abbildung 2. Zwei 1 %ige Thrombocid-Salben führten bei verschiedener Salbengrundlage zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

Bei nur zwei Versuchsreihen (Reihe 6 und 8) war zu keinem Zeitpunkt eine statistisch gesicherte Veränderung der Hyaluronidaseaktivität nachweisbar.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, daß verschiedene Heparin- und Heparinoidsalben durch die Haut resorbiert werden können. Als Grundlage für die Untersuchungen diente die Tatsache, daß Heparin und Heparinoide schon in geringen Mengen hemmend auf die Hyaluronidaseaktivität einwirken. Die Hemmung ist mit dem sogenannten Spreading-Test an weißen Ratten zu messen. Fast alle untersuchten Salben zeigten eine Hemmung. In welchen Mengen die Salben resorbiert werden, und insbesondere inwieweit die Blutgerinnung beeinflußt wird, kann allerdings nicht angegeben werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Mathies, H. und Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35, 892 (1957)
2. Mathies, H.: Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)
3. Mathies, H., Biechele, D. und Hartmann, M.: Ärtzt. Forsch. 14, I/160 (1960)
4. Mathies, H. und von Werther, G.: Arzneimittelforsch. 2, 576 (1959)
5. Mathies, H.: Zschr. ges. exper. Med. 131, 118 (1959)
6. Mathies, H.: Med. Mschr. 11, 791 (1957)
7. Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)
8. Mathies, H.: Pharmazie 14, 429 (1959)
9. Mathies, H.: Med. Klin. 52, 1676 (1957)
10. Mathies, H.: Ärtztl. Forsch. XII, I/87 (1958)
11. Mathies, H., Glück A., Poulantzas, J. und Schmidt, D.: Med. Exp. 1,64 (1959)
12. Mathies, H.: Verh. Dtsch. Ges. f. Inn. Med. 65, Kongreß 1959
13. Maxein, H.: München 1959
14. Ziware, P.: München in Vorbereitung
15. Hristoforis, A.: München in Vorbereitung
16. Werres, M.: München in Vorbereitung
17. Willms, P.: München in Vorbereitung
18. Wilhelmi, G.: zit. Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225 (1955), 14
19. Medinaveitia, J.: Biochemic. J. 32 (1938), 1806
20. Mathies, H.: Arch.int.pharmacodyn.CXXIII,344(1960)
21. Mathies, H.,und Burk, O.: Med.Exp.2: 329-333 (1960)

Herrn Prof. S e i t z danke ich für die Überlassung des
Themas. Herrn Dr. M a t h i e s danke ich für die Anre-
gung zu dieser Arbeit und für die erwiesene Unterstützung.
Herrn Dipl.Math. K. L i e b r i c h sage ich Dank für die
Durchführung der statistischen Berechnungen.

LEBENS LAUF

Am 20. November 1934 wurde ich als Sohn des Bankkaufmanns Otto Burk und seiner Ehefrau Ottilie, geborene Schmidt, in Frankfurt a.M. geboren. Wir wohnten damals in Bad Vilbel. 1938 siedelten wir nach Berlin und 1939 nach Wien über, weil mein Vater beruflich dorthin versetzt wurde. Als er 1941 zum Militär eingezogen wurde, kehrten meine Mutter und ich nach Bad Vilbel zurück. Hier kam ich im Herbst desselben Jahres zur Volksschule und 1945 in die Mittelschule. 1947 trat ich in die wiedereröffnete Ziehen-Schule in Frankfurt-Eschersheim über, wo ich meine Schulbildung 1955 mit dem Abitur abschloß. Zunächst trat ich in eine kaufmännische Lehre ein, die ich jedoch im April 1956 abbrach, weil ich mit dem Medizinstudium beginnen wollte. Im Sommer 1958 bestand ich in Frankfurt a.M. das ärztliche Vorexamen und studierte anschließend 1 Semester in Marburg und 2 in München. Die ärztliche Prüfung beendete ich am 27. Februar 1962 in Frankfurt a.M..

